

分散液相微萃取-HPLC 测定五味子中五味子甲素和五味子酯甲

孙晓迪, 胡爽*, 白小红, 周帜(山西医科大学药学院药物分析教研室, 太原 030001)

摘要: 目的 采用有机液体分散液相微萃取对五味子药材提取液进行纯化富集, 建立分散液相微萃取结合 HPLC 测定五味子甲素和五味子酯甲的含量。方法 分散液相微萃取以 60 μL 四氯化碳为萃取剂, 供相 pH 为 1, 萃取 4 min, 以转速 1 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min。在上述优化条件下, 对五味子药材提取液进行萃取后, 以 C_{18} 柱为固定相、甲醇-0.6%磷酸溶液 (69:31) 为流动相、检测波长 254 nm 进行色谱分析。结果 分散液相微萃取对五味子甲素和五味子酯甲的富集倍数分别为 5 112 和 1 118, 线性范围在 0.10~19 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间, 回收率分别为 100.1% 和 94.4%。结论 本法灵敏度高、重现性好, 简便、快速、环保, 可用于五味子药材中五味子甲素和五味子酯甲的含量测定。

关键词: 分散液相微萃取; 高效液相色谱法; 五味子; 五味子甲素; 五味子酯甲

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)02-0269-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.02.025

Organic Solvent-Based Dispersive Liquid Phase Microextraction Combined with HPLC for Determination of Schizandrin A and Schisantherin A in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.

SUN Xiaodi, HU Shuang*, BAI Xiaohong, ZHOU Zhi(Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To enrich and determine the schizandrin A and schisantherin A in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. by developing an organic solvent-based dispersive liquid phase microextraction combined with HPLC method. **METHODS** Under the optimal conditions(extraction solvent was CCl_4 , the volume of extraction solvent was 60 μL , pH of donor phase was 1 and the extraction time was 4 min, centrifuge at 1 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ for 2 min), the analytes were extracted. HPLC analyses were performed on a C_{18} column. The mobile phase consisted of a mixture of methanol and phosphorous acid solution (69:31), and the detection wavelength was set at 254 nm. **RESULTS** The enrichment factors for schizandrin A and schisantherin A were 5 112 and 1 118, respectively. The linear range was both 0.10~19 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. And the recoveries of analytes were 100.1% for schizandrin A and 94.4% for schisantherin A, respectively. **CONCLUSION** The method is sensitive, reproducible, simple, rapid and environmental protection, and it can be used to determine schizandrin A and schisantherin A in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.. **KEY WORDS:** dispersive liquid phase microextraction; HPLC; *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.; schizandrin A; schisantherin A

五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实, 始载于《神农本草经》, 被列为上品; 具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心之功效^[1]。现代化学和药理学研究表明, 五味子的活性成分主要包括五味子甲素(schizandrin A)、五味子乙素(schizandrin B)、五味子酯甲(schisantherin A)、五味子酯乙(schisantherin B)等木脂素类化合物, 该类成分具有保肝降酶、舒张血管、镇定抗惊厥等药理作用^[2-3]。木脂素类化合物的提取方法主要包括超声提取法、微波萃取法、超临界 CO_2 提取^[4]等, 但这些方法有的费时、浓缩倍数小、操作复杂; 有的需要特殊仪器, 价格较贵。

分散液相微萃取(dispersive liquid phase microextraction, DLPME)是由 Assadi 等在 2006 年提出的一种新型样品前处理技术^[5], 具有操作简

便、快速、成本低、回收率和富集倍数高、环境污染小的优点^[6]; 目前已成功应用于水样、土壤、茶叶、蔬果等样品中微量有机物和无机物的萃取富集^[6-7], 但在中药分析中的应用不多^[8-9]。本研究建立了有机溶剂分散液相微萃取-HPLC 方法, 对五味子甲醇提取液中的五味子甲素和五味子酯甲 2 种主要木脂素类成分进行同时、快速测定, 为中药分析的样品前处理提供了新的研究思路, 2 种成分的结构式见图 1。

1 仪器与试剂

CBM-10A VP plus、SPD-10A VP plus、LC-10AT VP plus 高效液相色谱仪(日本岛津); N2000 双通道色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所); Shangping MD 110-2 型电子天平(上海天平仪器厂); KQ3200DB 型超声清洗仪(昆山); 800 型离心沉淀仪(上海手术器械厂)。

作者简介: 孙晓迪, 女, 硕士生 Tel: (0351)4690071 E-mail: 2218191443@qq.com *通信作者: 胡爽, 女, 博士, 副教授 Tel: (0351) 4690071 E-mail: hurrah3743@163.com

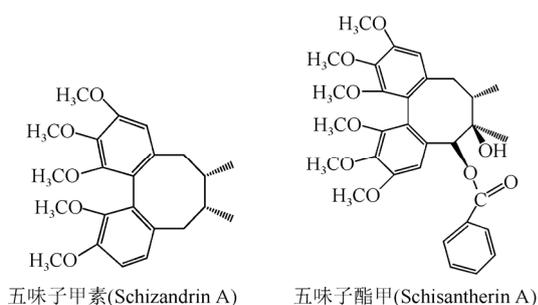


图1 2种木脂素类成分结构式

Fig. 1 Chemical structures of 2 types of lignans

五味子甲素、五味子酯甲对照品(纯度 $\geq 98\%$, 批号: MUST-1121604、MUST-11070612, 成都曼斯特生物技术有限公司)。不同产地五味子药材为市售, 呈不规则的球形或扁球形, 表面红色、紫红色或暗红色, 皱缩, 显油润, 经山西医科大学药学院白云娥副教授鉴定均为 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实。四氯化碳(CCl_4)、二氯甲烷、1,2-二氯乙烷、氯仿、磷酸均为分析纯, 甲醇为色谱纯, 水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

C_{18} 色谱柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm , Agilent), 流动相: 甲醇-0.6%磷酸溶液(69:31), 检测波长 254 nm, 进样量 20 μL , 流速 1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品储备液 取五味子甲素、五味子酯甲对照品各约 10 mg, 精密称定, 加甲醇溶解制成浓度均为 0.40 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 备用。

2.2.2 供试品溶液 将不同产地五味子药材研细, 取粉末(过三号筛)约 0.5 g, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇约 20 mL 超声(150 W, 40 kHz)处理 45 min, 取出放至室温后用甲醇定容, 摇匀。取上清液, 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。

2.3 分散液相微萃取步骤

在 10 mL 具塞离心管中, 依次加入 480 μL 对照液或供试液、600 μL HCl 溶液(1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$), 以水稀释至 6 mL, 再加 60 μL CCl_4 作萃取剂, 充分振荡后形成白色云雾状浑浊体系, 静置 4 min。1 500 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 离心管底部形成萃取剂聚集液滴, 用微量进样器抽取 40 μL 置于 5 mL 小烧杯中将其挥干, 50 μL 甲醇溶解残渣, 摇匀后进样测定。

2.4 分析方法验证

2.4.1 线性关系考察 精密量取不同体积的

“2.2.1”项下混合对照品储备液, 制成五味子甲素和五味子酯甲系列浓度均为 0.10, 0.15, 0.45, 0.90, 1.5, 3.0, 7.0, 19 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照液; 分别按“2.3”项下操作进行分散液相微萃取, 进样分析。以色谱峰面积 Y 对分析物浓度 X 进行线性回归。五味子甲素和酯甲均在 0.10~19 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 其峰面积与浓度间呈良好的线性关系, 回归方程分别为 $Y=81\ 767X+858.71(r^2=0.999\ 0)$ 、 $Y=60\ 722X-5\ 435.3(r^2=0.997\ 1)$ 。

2.4.2 精密度试验 分别取低(0.45 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中(1.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、高(7.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)3种不同浓度的对照液, 每个浓度平行 3 份, 分别按“2.3”项下操作进行分散液相微萃取, 进样分析。五味子甲素和酯甲的日内精密度 RSD 均 $<2.7\%$ ($n=9$)、日间精密度 RSD $<8.4\%$ ($n=9$)。

2.4.3 加样回收率试验 精密量取已知浓度的黑龙江(I)五味子供试液 240 μL 置离心管中, 再加入 240 μL 的 7.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照液, 进行分散液相微萃取, 进样分析。按下式计算回收率:

$$\text{回收率} = \frac{\text{测得的分析物质量} - \text{样品中分析物质量}}{\text{加入对照液中分析物质量}} \times 100\%$$

测得五味子甲素和五味子酯甲的平均回收率分别为 100.1%(RSD=5.6%, $n=6$)和 94.4% (RSD=5.5%, $n=6$)。

2.4.4 检测限和定量限 按照“2.2.2”项要求制备黑龙江 II 供试液, 以甲醇逐级稀释后, 分别按“2.3”项下操作进行分散液相微萃取, 再进样测定。以 $S/N=3$ 时所对应的分析物浓度作为检测限, 测得五味子甲素和酯甲的检测限分别为 4.0 和 4.3 ng $\cdot\text{mL}^{-1}$; 以 $S/N=10$ 时所对应的分析物浓度作为定量限, 分别为 13 和 15 ng $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.5 样品测定

按照“2.2.2”项和“2.3”项下操作, 取五味子药材粉末, 精密称定, 进行供试液制备与分散液相微萃取, 采用 HPLC 测定, 每个产地的五味子药材提取液平行萃取测定 3 次, 代表性色谱图见图 2。根据“2.4.1”项下线性方程计算不同产地五味子药材中五味子甲素和五味子酯甲的含量, 结果见表 1。

3 讨论

3.1 分散液相微萃取条件优化

为了达到最好的富集效果, 首先进行了微萃取条件的优化, 包括: 萃取剂种类和体积、供相

表 1 样品测定结果($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Results of sample determination($n=3, \bar{x} \pm s$)

分析物	样品含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$				
	黑龙江 I	黑龙江 II	辽宁 I	辽宁 II	辽宁 III
五味子甲素	2.02 ± 0.37	5.64 ± 0.62	0.90 ± 0.02	0.98 ± 0.09	0.90 ± 0.10
五味子酯甲	1.95 ± 0.04	5.14 ± 0.67	0.96 ± 0.07	1.08 ± 0.02	0.92 ± 0.15

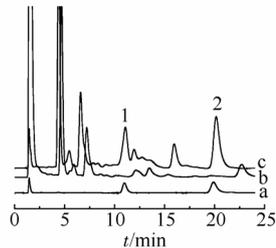


图 2 微萃取前后的色谱图

a- $7.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照液, b-药材供试液未经微萃取直接进样, c-药材供试液经微萃取后进样; 1-五味子酯甲; 2-五味子甲素

Fig. 2 HPLC chromatograms of reference substances and sample before and after DLPME

a-reference substances, b-sample solution without DLPME, c-sample solution using DLPME; 1-schisantherin A, 2-schizandrin A

pH 和体积、萃取时间、盐浓度、离心转速和时间等。其中, 萃取剂种类是影响萃取效率的关键因素, 它需满足: ①密度比水大且不与水互溶, 利于与水相很好分离; ②对目标物要有较大溶解度; ③挥发性适中: 挥发性太大, 在萃取过程中易造成损耗; 挥发性太小, 萃取后不易挥干, 可能会影响高效液相色谱测定。本实验考察了同体积的二氯甲烷、1,2-二氯乙烷、三氯甲烷、 CCl_4 作为萃取剂, 结果显示, CCl_4 对 2 种木脂素类成分均具有最好的萃取效果, 且重现性较其他溶剂更好, 因此选 CCl_4 作为萃取剂, 结果见图 3。

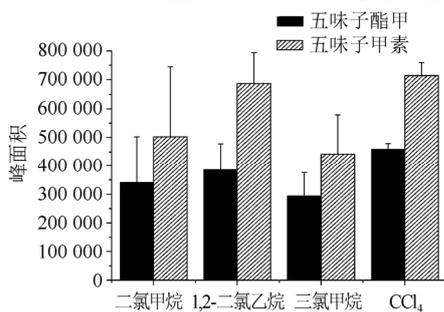


图 3 萃取剂种类对萃取效率的影响

分析物浓度均为 $7.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 萃取剂体积: $60 \mu\text{L}$; pH: 1; 萃取时间: 4 min; 供相体积: 6mL ; 离心转速: $1500 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$; 离心时间: 2 min。

Fig. 3 Effect of extractant type on extraction efficiency of lignans

$C_{\text{lignans}}=7.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; extractant volume: $60 \mu\text{L}$; pH: 1; extraction time: 4 min; sample volume: 6mL ; centrifugal speed: $1500 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$; centrifugal time: 2 min.

3.2 分散液相微萃取对木脂素类化合物的富集倍数计算

微萃取达平衡后, 富集倍数(enrichment factor, EF)由聚集相中分析物浓度与样品相中分析物浓度比值计算, 即:

$$EF = \frac{C_{\text{聚集相}}}{C_{\text{样品相}}}$$

测得五味子酯甲、五味子甲的富集倍数分别为 1 118 倍、5 112 倍, 可见, 五味子药材提取液经分散液相微萃取前处理后, 测定灵敏度有很大提高, 这一点从检测限值亦可得到验证。

本实验测定的 5 个不同产地的北五味子药材, 即使同样来自黑龙江的 2 种药材中的五味子甲素和酯甲的含量差异也非常大, 可能与具体的产地差异、药材采收期和贮存时间长短等因素的不同有关。

综上所述, 分散液相微萃取是一种简单、快速的样品前处理方法; 有机溶剂用量小, 无需特殊设备。该法可选择性地对五味子药材中的五味子酯甲和五味子甲素进行萃取纯化和富集, 为该药材的质量控制提供了可靠的新方法。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 66.
- [2] JIN J. Research of *Schisandra Chinensis* (Turez.) Baill. [J]. Heilongjiang Med J(黑龙江医药), 2005, 18(5): 335.
- [3] MIAO M S, ZHANG G W, MA X. Effect of *Schisandra chinensis* Baill. distilled by ethanol on the ability of learning and memory in memory impairment mice model induced by repeated cerebral ischemia-reperfusion [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2009, 26(5): 353-356.
- [4] 程振玉, 宋海燕, 杨英杰, 等. 五味子木脂素提取方法的最新研究进展[J]. 中成药, 2015, 37(11): 2485-2491.
- [5] REZAEI M, ASSADI Y, HOSSEINI M M, et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction [J]. J Chromatogr A, 2006, 1116(1-2): 1-9.
- [6] HERRERA-HERRERA A V, ASENSIO-RAMOS M, HERNÁNDEZ-BORGES J, et al. Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes [J]. Trac Trend Anal Chem, 2010, 29(7): 728-751.
- [7] ZGOLA-GRZEŠKOWIAK A, GRZEŠKOWIAK T. Dispersive liquid-liquid microextraction [J]. Trac Trend Anal Chem, 2011, 30(9): 1382-1399.
- [8] TIAN J, CHEN X, BAI X H. Mechanism and comparison of dispersive liquid phase microextraction based on organic solvent and ionic liquid for determination of compounds in traditional Chinese medicine [J]. Chinese J Anal Chem(分析化学), 2010, 38 (11): 1593-1598.
- [9] WU H L, LI G L, LIU S C, et al. Simultaneous determination of six triterpenic acids in some Chinese medicinal herbs using ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015(107): 98-107.

收稿日期: 2016-07-06